

第4章 フィターゼによる家畜飼料中のフィチン態リンの分解に 及ぼす Zn 及び Cu の影響

4-1 はじめに

豚や家禽などの単胃動物の飼料は，トウモロコシ，マイロ，ダイズなどの作物種子由来の原料を主体として配合されている。これら原料中のリンの多くは，フィチン酸の形で存在している。このフィチン態リンは Zn や Cu などのミネラルと結合しやすく，不溶解性の錯体となり，フィターゼによる分解されにくくなると指摘している (Maenz, 1999)。一方，Zn 及び Cu は微量元素として家畜の成長促進のために，多量に飼料へ添加されているケースが多い。飼料に高濃度の Zn 及び Cu の添加は，フィターゼによるフィチン態リンの分解を抑制するとともに，多量の Zn 及び Cu をふんに排泄させると考えられる。こうした家畜ふん中のフィチン酸の分解も抑制される上で，フィターゼを有する微生物を接種した際にも，Zn や Cu がその活性を阻害すると懸念される。そして，調製した堆肥を施用した土壤でも Zn や Cu が蓄積して，土壤汚染を引き起こす原因になりうる。そこで，本章では，Zn 及び Cu がフィターゼによるフィチン態リンの分解にどの程度影響を与えるかを調べるために，フィチン酸 Na，または，家畜飼料の主原料であるトウモロコシ，マイロ及びダイズ粕を使用して，フィターゼによるフィチン態リンの分解に及ぼす Zn 及び Cu の影響を検討した。

4-2 実験材料及び方法

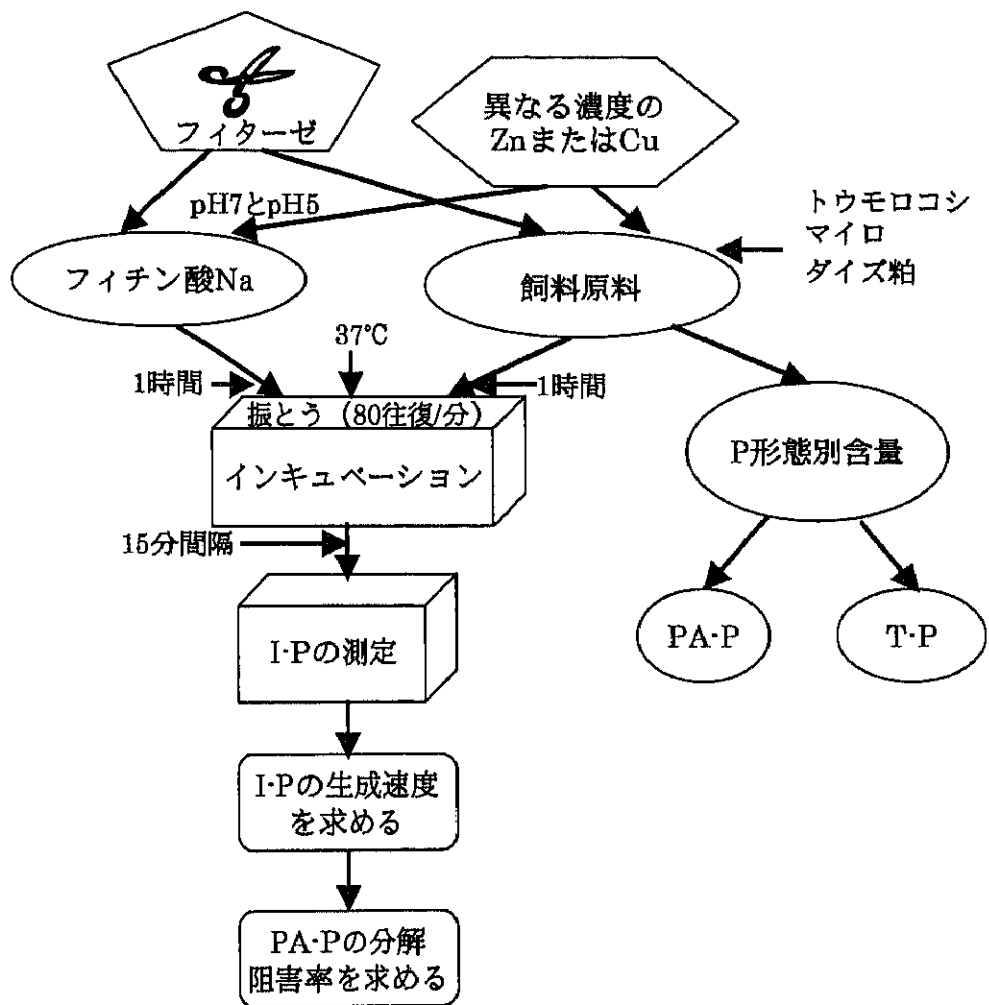


図 4-1 実験手順

実験手順は図 4-1 の通りであり，具体的な方法は次に示す。

4-2-1 飼料原料中のリン形態別含量の測定

市販飼料原料のトウモロコシ，マイロ及びダイズ粕（清水港飼料株式会社製）を供試した。これらの風乾原料を粉碎機で粉碎し，35 メッシュのふるいにかけて，乾燥剤入りのデシケーターに保存した後，飼料原料中の全リンとフィチン態リン含量を測定した。全リン含量は APHA・AWWA・WPCF（1976）の方法に従い，飼料原料からそれぞれ 0.5 g ずつの 3 つのサブサンプルを採取し，分光光度計（DR/4000，Hach 社製，USA）で測定を行なった。フィチン態リンの含量は，武政・村上（1995）の方法によって，0.5 g ずつの 3 つのサブサンプルを採取し，0.5 U/ml のフィターゼ溶液 10 ml を加え，55℃で 16 時間インキュベートした後測定を行なった。

4-2-2 フィチン態リンのフィターゼによる分解に及ぼす Zn 及び Cu の濃度の影響

実験 1 フィチン酸 Na のフィターゼによる分解に及ぼす Zn 及び Cu の濃度の影響

ZnSO₄（和光純薬，化学用）と CuSO₄（和光純薬，試薬一級）とフィチン酸 Na（コメ由来，Sigma，純度 96%）及びフィターゼ（小麦由来，Sigma，活性単位 0.03 U/ mg。活性単位（U）は pH5.15，55℃で 1.5 mM フィチン酸 Na から 1 分間に 1 μmol の無機リンを遊離する酵素の量）を使用した。

上記試薬を溶解した溶液をそれぞれ別個に 37℃の恒温振とう水槽で 1 時間予熱した後に，基本的には武政・村上（1995）の方

法に従って実験を行なった。すなわち、10 mM フィチン酸 Na 溶液 1ml (フィチン態リン濃度は 1.7 mg/ml) に対し、異なる濃度の Zn または Cu の溶液 1 ml を加えて、pH7 または pH5 の 0.5M 酢酸緩衝液に溶解した 0.5 U/ml のフィターゼ溶液 8 ml を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。次いで、0、15、30、45 及び 60 分後に、反応液 1 ml を取り、これに 6% トリクロル酢酸溶液 5 ml を加えて反応を停止させ、ろ過して、ろ液 1 ml について、無機リン量を分光光度計 (DR/4000, Hach 社製, USA) で測定した。また、0 時間で得られた値をブランク値とし、異なる濃度の Zn または Cu を添加した条件におけるフィターゼによるフィチン態リンからの無機リンの生成速度を求めた。一連の実験を 3 回繰り返して、各 pH と濃度での無機リン生成速度の平均値を求めた。そして、無機リン生成速度から、Zn 及び Cu の各濃度におけるフィチン態リンの分解阻害率を計算した。すなわち、Zn 及び Cu を添加した条件でのフィターゼによるフィチン態リンからの無機リンの生成速度が、Zn 及び Cu 無添加ときの無機リンの生成速度と比べて低下した割合で、次の式によって計算した。

$$IR = \frac{S_0 - S_a}{S_0} \times 100 (\%)$$

ここで、

IR : フィチン態リンの分解阻害率

S_0 : Zn または Cu が無添加ときのフィチン態リンからの無機リンの生成速度 (mg I-P/mg PA-P · h)

S_a : Zn または Cu を添加したときのフィチン態リンからの無機リンの生成速度 (mg I-P/mg PA-P · h)

実験 2 飼料原料中のフィチン態リンのフィターゼによる分解 に及ぼす Zn 及び Cu の濃度の影響

日本飼養標準・豚のリンの形態別含量（表 1）を参考にして、
実験 1 で用いたフィチン酸 Na 中のリンに相当すると計算される
量のフィチン態リン（反応液 1 ml 中 0.17 mg）を含むトウモロコ
シ，マイロ及びダイズ粕を用いて，実験 1 と同様な反応系によっ
て，遊離した無機リン量を測定した。

4-3 結果及び考察

4-3-1 飼料原料中のリン形態別含量の測定

表 4-1 は供試した飼料原料中のリン形態別含量を示す。日本飼
養標準・豚の値と比べて，トウモロコシ，マイロ及びダイズ粕中
の全リンとフィチン態リン含量はやや高く，非フィチン態リン含
量はダイズ粕だけやや低かった。このため，用いた飼料原料中の
フィチン態リン濃度は，反応液 1 ml 当たり，日本飼養標準・豚
を参考にした値では，0.17 mg であるが，実際のフィチン態リン
濃度では，トウモロコシで 0.24 mg，マイロで 0.27 mg，ダイズ
粕で 0.28 mg となった。

4-3-2 フィチン態リンのフィターゼによる分解に及ぼす Zn 及び Cu の濃度の影響

実験 1 フィチン酸 Na のフィターゼによる分解に及ぼす Zn 及
び Cu の濃度の影響

フィチン酸 Na からの無機リン生成速度は，フィチン態リン 1
mg から 1 時間に生成される無機リンの mg で表示した。無機リン

表 4-1 供試した飼料原料中のリン形態別含量（原物中％）

飼料原料名	全リン	非フィチン態リン	フィチン態リン
ダイズ粕	0.79 (0.62)	0.31 (0.33)	0.48 (0.29)
トウモロコシ	0.35 (0.27)	0.10 (0.09)	0.25 (0.18)
マイロ	0.44 (0.26)	0.15 (0.08)	0.29 (0.18)

()は日本飼養標準・豚（1998）の値

生成速度から求めた Zn 及び Cu の各濃度におけるフィチン酸 Na の分解阻害率は、図 4・2 に示すように、Zn と Cu の濃度ならびに pH に大きく影響された。すなわち、

1. Zn 及び Cu の濃度が高いほど、フィターゼによるフィチン酸 Na の分解に対する阻害率が高くなった。これは、Zn 及び Cu がフィチン酸のリン酸基と結合してリン酸基をマスクし、フィターゼによるフィチン態リンの分解を受けにくくしたためと推定される。
2. 同じ Zn 及び Cu の濃度では、pH5 より pH7 の方でフィチン態リンの分解がかなり阻害された。これは pH が高いほどフィチン酸のリン酸基と金属との結合が安定になるためと推定される。
3. 同じ pH では特に 2 mM 以上の金属濃度において、Cu に比べて、Zn によるフィチン態リンから無機リンの分解阻害率が高くなった。これは、Zn の方が Cu よりもフィチン態リンと安定的に結合し、解離しにくいためと推定される。

実験 2. 飼料原料中のフィチン態リンのフィターゼによる分解に及ぼす Zn 及び Cu の濃度の影響

粉碎した飼料原料のトウモロコシ、マイロ及びダイズ粕中のフィチン態リンの分解阻害率は、いずれもフィチン酸 Na の場合と同様に Zn と Cu の濃度及び pH に大きく影響された。

図 4・3~4 に示すように Zn 及び Cu 濃度の上昇に伴って、飼料原料中のフィチン態リンの分解阻害率が増加したが、その増加程度は、フィチン酸 Na の場合よりも緩やかな傾向を示した。すなわち、飼料原料からの無機リン生成速度は、Zn 及び Cu を添加し

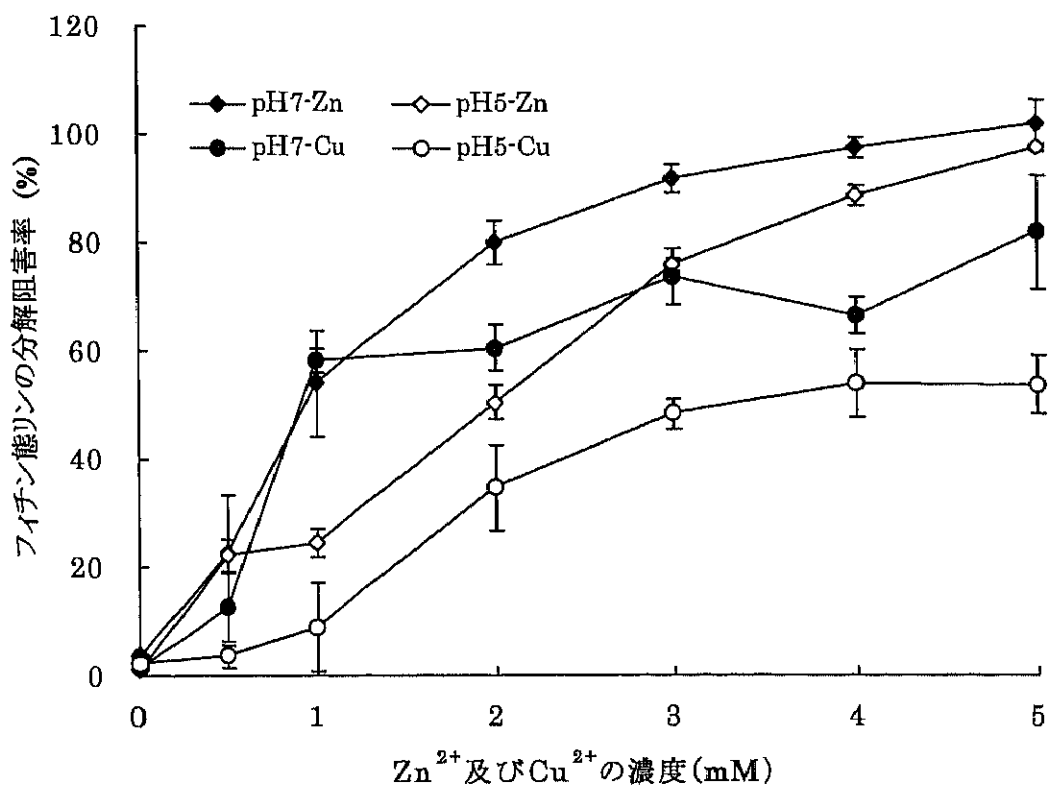


図 4-2 pH7 と pH5 におけるフィチン酸 Na 中のフィチン態リンの分解阻害率と Zn 及び Cu の濃度の関係

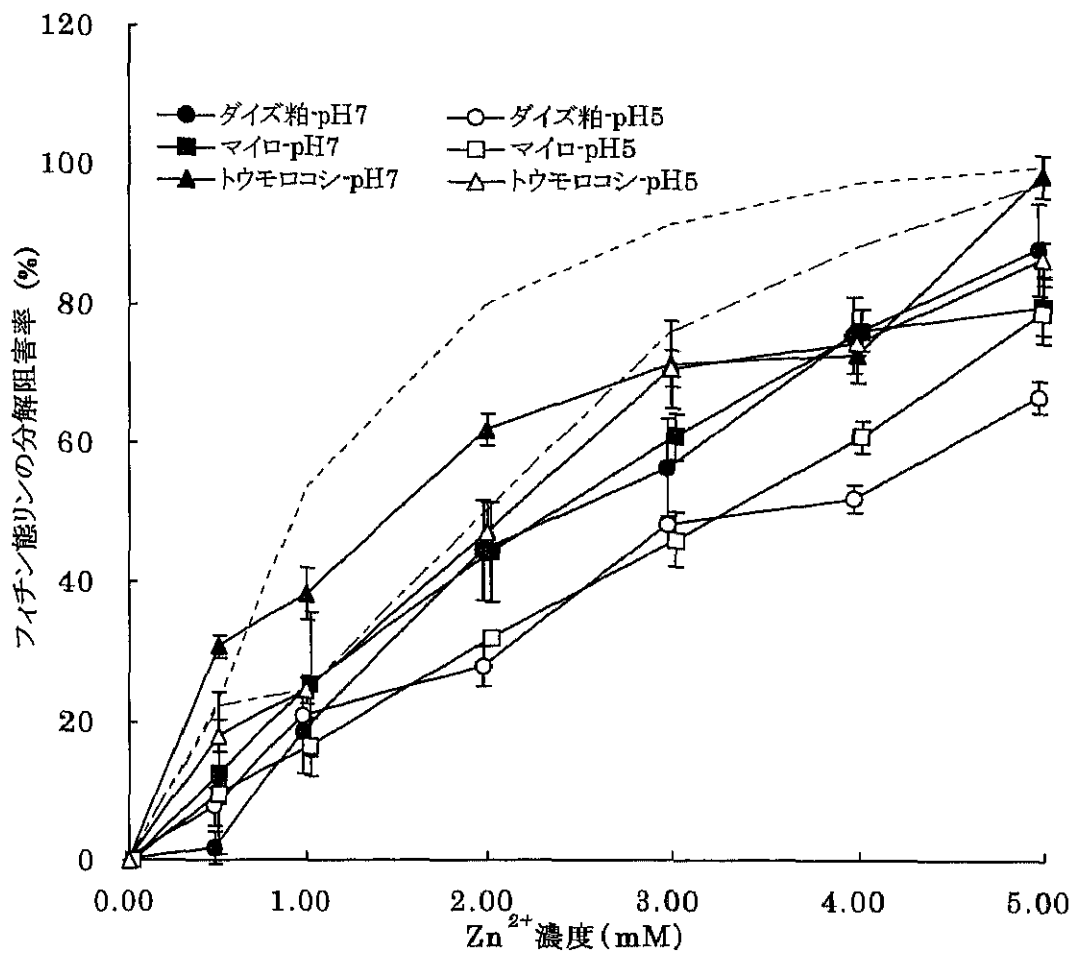


図 4-3 pH7 と pH5 における飼料原料中のフィチン態リンの分解阻害率と Zn 濃度の関係

注： 図中の上の破線はフィチン酸 Na-pH7，下の一点鎖線はフィチン酸 Na-pH5 の場合のフィチン態リン分解阻害率を示す。

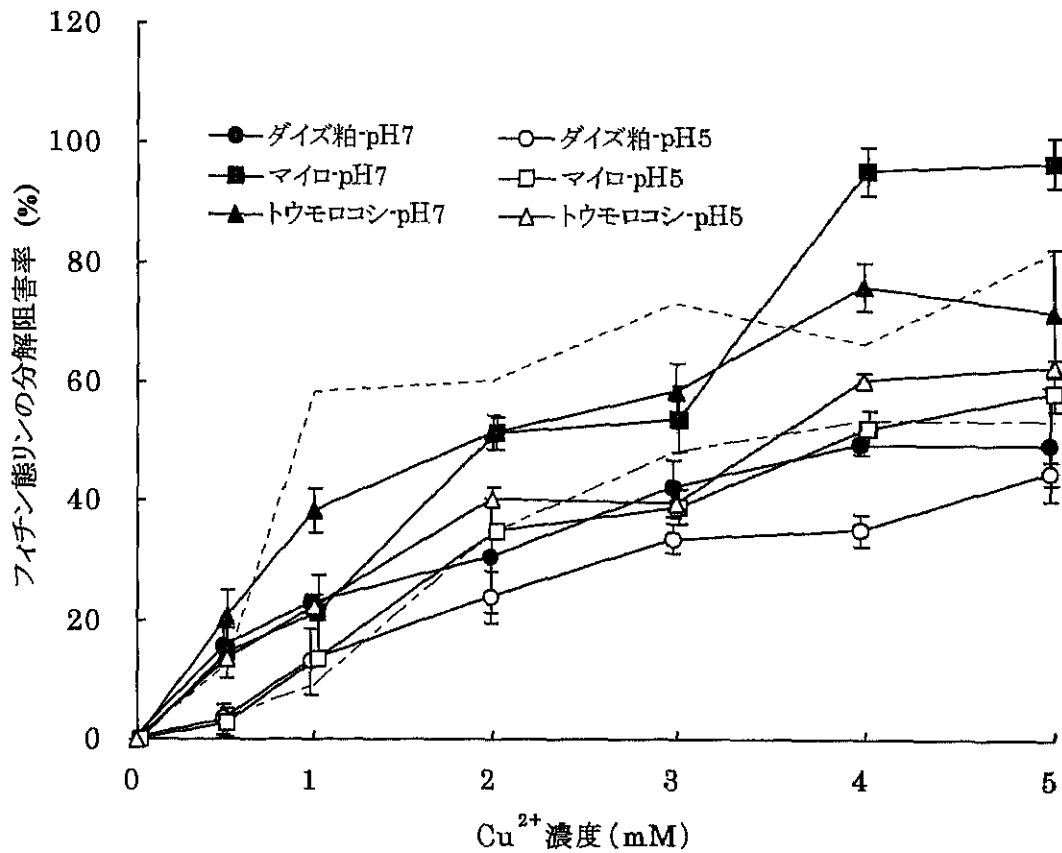


図 4-4 pH7 と pH5 における飼料原料中のフィチン態リンの分解阻害率と Cu 濃度の関係

注： 図中の上の破線はフィチン酸 Na・pH7，下の一点鎖線はフィチン酸 Na・pH5 の場合のフィチン態リン分解阻害率を示す。

ない場合、フィチン酸 Na からの場合よりも低かった。しかし、Zn の添加濃度を高めてゆくと、無機リン生成速度の減衰が緩慢であるため、飼料原料からの無機リン生成速度はフィチン酸 Na の場合よりも高くなった。Cu 添加の場合も、基本的には Zn 添加の場合と同様であった。

飼料原料中のフィチン態リンの多くはミネラルやタンパク質などと複雑に結合しており、その中には pH5 や pH7 の条件ではミネラルやタンパク質などから解離できず、フィターゼとの反応が阻害されているものが存在すると考えられる。このため、Zn や Cu を添加しない場合に、飼料原料からの無機リン生成速度がフィチン酸 Na の場合よりも低くなると推定される。そして、飼料原料に添加された Zn や Cu は原料組織中のマイナス電荷を持った多くの成分と結合するため、フィチン態リンと結合する Zn や Cu の量が低下すると考えられる。このため、飼料原料中のフィチン態リンの分解に及ぼす Zn または Cu の阻害が、フィチン酸 Na の場合より弱くなると推定される。

三つの飼料原料を比較すると、Zn 及び Cu によるフィチン態リンの分解阻害はトウモロコシとマイロに比べて、ダイズ粕で低かった。三つの飼料原料中のタンパク質含量が最も高いのはダイズ粕である（亀高ら，1991）。これらのことから、タンパク質のカルボキシル基が Zn 及び Cu と結合して、フィチン態リンと結合する Zn 及び Cu の濃度を低くするので、Zn 及び Cu の存在下におけるダイズ粕からの無機リン生成速度が、Zn や Cu の添加によって阻害を弱くなると推定される。

4-3-3 フィチン態リンの分解阻害率と Zn 及び Cu の濃度の関係

図 4-2~4 に示した結果について、フィチン態リンの分解阻害率と Zn 及び Cu 濃度の関係の整理を試みた。すなわち、Zn 及び Cu の濃度と分解阻害率の関係を示す三次式を求めた（一例を図 4-5 に示す）。そして、二分法により任意のフィチン態リンの分解阻害率における Zn 及び Cu の濃度を求めた。その結果を表 4-2 に示す。フィチン酸 Na ではフィチン態リンの分解を 50%阻害する Zn 及び Cu の濃度は、pH7 のとき、Zn と Cu でそれぞれ 0.98 と 1.12 mM であり、pH5 のとき、それぞれ 1.89 と 3.19 mM であった。また、飼料原料では、pH7 のとき、Zn と Cu でそれぞれ 1.26~2.50 と 1.77~4.58 mM であり、pH5 のとき、それぞれ 2.05~3.56 と 3.36~5.84 mM であった。そして、同じ分解阻害率を起こす Zn 及び Cu の濃度は、ダイズ粕>マイロ>トウモロコシの順であった。Zn 及び Cu によるフィチン態リンの分解阻害率はトウモロコシで最も高かった。

単胃家畜の飼料では、通常トウモロコシの配合比率が高くなっているため、フィターゼによる飼料中のフィチン態リンの分解阻害に対する Zn 及び Cu からの影響も高くなると考えられる。

豚に給餌する一頭・日当たり平均の風乾飼料量は約 3 kg であり、腸管（小腸と大腸）の平均内容積は約 19 l である（亀高ら、1991）。内容物が内容積の 70~100%を占めると仮定すると、内容物の容積は 13~19 l となる。実際に流通している豚用飼料中の Zn 及び Cu の平均含量についての磯部ら（1999）の調査結果を適用すると、腸管内容物中の Zn と Cu の濃度は、それぞれ 0.30~0.43 mM と 0.08~0.11 mM になると計算される。日本飼養標準の値（Zn, 50~100 mg/kg; Cu, 3~6 mg/kg）について同様に計算すれば、腸管内容物中の Zn と Cu の濃度は、それぞれ 0.12~0.36 mM と

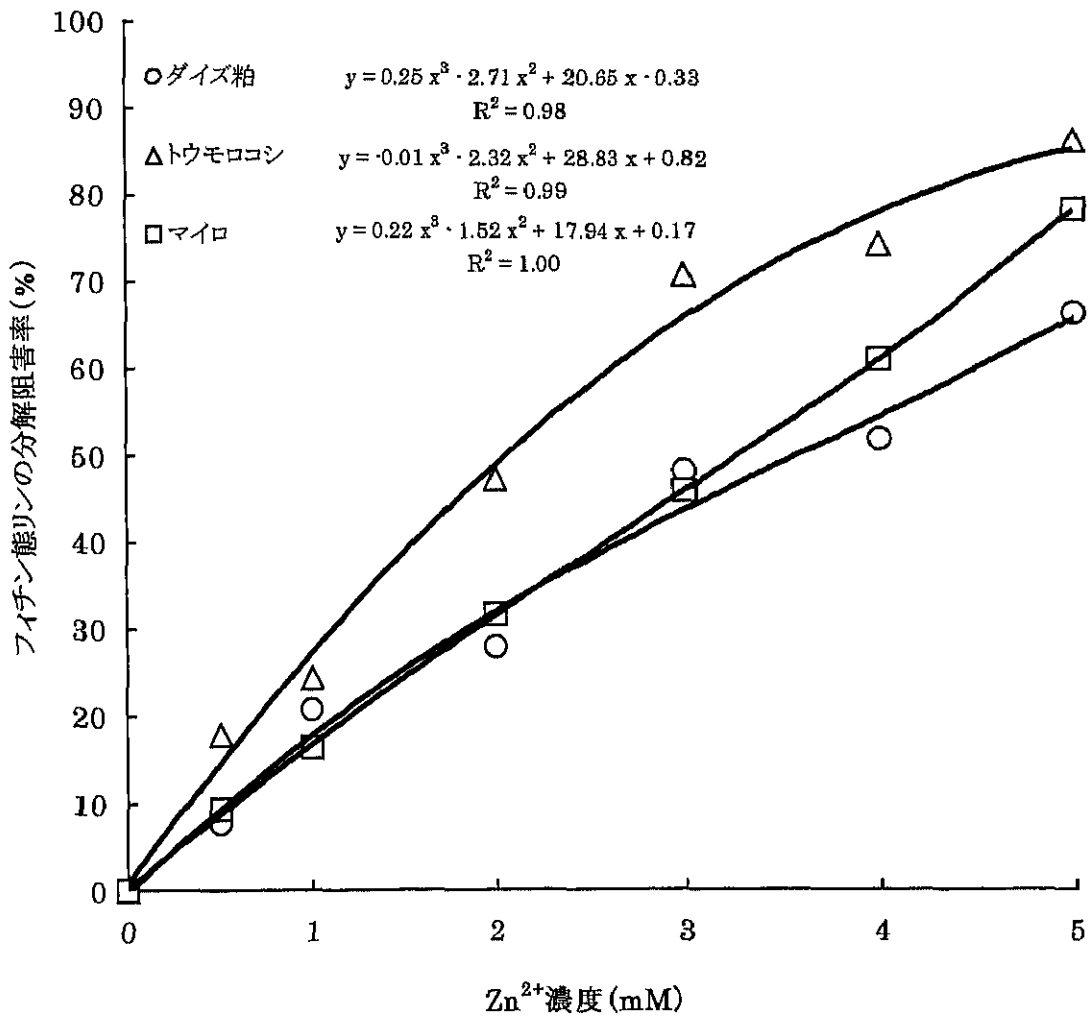


図 4-5 pH5 における飼料原料中のフィチン態リンの分解阻害率と Zn 濃度の関係

表 4.2 pH7 と pH5 におけるフィチン態リンの分解阻害率と Zn 及び Cu の濃度 (mM) の関係

pH	7						5					
	10	20	30	40	50	60	10	20	30	40	50	60
Zn ²⁺ 濃度 (mM)												
フィチン酸 Na	0.19	0.36	0.54	0.75	0.98	1.25	0.29	0.68	1.07	1.48	1.89	2.33
ダイズ粕	0.62	1.08	1.54	2.01	2.50	3.03	0.54	1.14	1.84	2.65	3.56	4.47
トウモロコシ	0.16	0.36	0.60	0.88	1.26	1.86	0.33	0.71	1.11	1.55	2.05	2.60
マイロ	0.39	0.82	1.27	1.74	2.26	2.84	0.57	1.21	1.88	2.58	3.26	3.91
Cu ²⁺ 濃度 (mM)												
フィチン酸 Na	0.22	0.39	0.59	0.83	1.12	1.55	0.85	1.41	1.95	2.51	3.19	4.26
ダイズ粕	0.36	0.94	1.67	2.70	4.58	7.50	0.78	1.64	2.79	4.31	5.84	6.99
トウモロコシ	0.21	0.51	0.84	1.25	1.77	2.51	0.38	0.86	1.45	2.26	3.36	4.56
マイロ	0.41	0.87	1.32	1.77	2.22	2.67	0.71	1.33	2.00	2.77	3.73	5.49

0.007~0.022 mMとなる。日本飼養標準に比べて、Znで1.2~2.4倍、Cuで5.2~10.4倍となり、過剰投与と考えられる。飼料中の栄養素の分解・吸収は主に腸管で行われるが、家畜の胃のpHは2であるのに対して、腸管のpHは7前後である(亀高ら,1991)。このため、腸管中のZnとCuはフィチン酸のリン酸基と結合しやすくなる。上述の磯部ら(1999)の結果から計算した腸管におけるZnとCuの濃度を表4・2と比較すると、トウモロコシの場合、pH7において、フィターゼによるフィチン態リンの分解が、5~20%阻害されると推測される。これは単純計算を行なった場合であるが、実際には消化に伴って一般的栄養素(炭水化物、タンパク質、脂肪など)の大部分(80%程度)が吸収されていくのに対して(亀高ら,1991)、ZnやCuはごく一部(10~20%程度)しか吸収されない(高田,2004)。このため、消化管内でのZnとCuの濃度は消化とともに高まって、フィチン態リンの分解阻害率は上記の数倍に達すると推定される。さらに、飼料にはCa、MgやFeなどのミネラルも添加されており、これらのミネラルも加わって、トウモロコシの場合には腸管におけるフィターゼによるフィチン態リンの分解阻害は無視できないであろう。

今後、飼料へのフィターゼの添加技術が普及すれば、飼料への無機リン酸塩の添加は削減されるか添加されなくなると予想される。その際、高濃度のZn及びCuの添加は、フィチン酸の分解を阻害して、家畜のリン酸吸収を著しく阻害すると懸念される。これゆえ、飼料に添加したフィターゼの活性を最大限に発揮するために、飼料への必要以上のZn及びCuの添加量を抑制させることは、フィチン態リンの利用率を向上させ、さらに、家畜ふん尿堆肥施用に伴う土壌のZn及びCuの汚染を軽減させる点でも有意

義であると期待できる。

表 4・3 は折原らが（2002）神奈川県内で生産されている家畜ふん堆肥の重金属含有量を調査した結果である。表に示すように、各家畜ふん堆肥の Zn 及び Cu 含有量の平均値は高くなっている。Zn 及び Cu の濃度が高い場合には、消化管内のみならず、ふんの堆肥化過程においても、微生物のフィターゼによるフィチン態リンの分解が強く阻害されることが懸念される。このため、家畜ふん中のフィチン態リンの微生物による分解を促進するには、飼料への必要以上の Zn 及び Cu の添加量を抑制させた上で、強力なフィチン態リン分解微生物の利用が今後検討すべき課題と考えられる。

表 4-3 家畜ふん堆肥の Zn 及び Cu の平均含有量

堆肥	牛	豚	鶏
Zn	258	630	379
濃度 (mM)	4.0	9.7	5.8
Cu	73	185	43
濃度 (mM)	1.1	2.9	0.7

注： 神奈川県の家畜ふん堆肥の調査データ（折原ら，2002）。

濃度は堆肥 1kg を 1ℓとした。

4-4 まとめ

家畜飼料の主原料であるトウモロコシ，マイロ及びダイズ粕を使用して，フィターゼによる飼料中のフィチン態リンの分解に及ぼす Zn 及び Cu の影響を検討した。

飼料原料粉末と Zn または Cu の溶液を入れた試験管に pH7 または pH5 のフィターゼ溶液（0.5M 酢酸緩衝液に溶解したもの）を加え，37℃で1時間インキュベートした際のフィチン態リンの分解阻害率を比較した。Zn 及び Cu の濃度が高いほど，また pH が高いほど，フィターゼによるフィチン態リンの分解阻害率が高くなった。同じ pH では特に 2 mM 以上の濃度において，Cu に比べて，Zn によるフィチン態リンの分解阻害率が高くなった。三つの飼料原料を比較すると，Zn 及び Cu によるフィチン態リンの分解阻害率はトウモロコシ>マイロ>ダイズ粕の順であった。

Zn 及び Cu の濃度が高い場合には，フィチン態リンの分解に及ぼす影響は，家畜の消化管内のみならず，排泄されたふん中のフィチン態リンの分解に影響を与えられられる。

飼料に添加したフィターゼの活性を最大限に発揮させ，フィチン態リンの利用率を向上させるには，日本飼料標準を超える過剰な Zn 及び Cu の飼料への添加を抑制させる必要があると考えられる。また，Zn 及び Cu の含有量が高い堆肥中のフィチン態リンを十分分解するために，強力なフィチン酸分解菌の分離及び堆肥への応用が重要になる。